

SERVICE REGIONAL de la
PROTECTION des VEGETAUX
CHAMPAGNE-ARDENNE
B.P. 1154 51056 REIMS CEDEX

DU PONT DE NEMOURS (FRANCE) S.A.
137, RUE DE L'UNIVERSITE
75334 PARIS CEDEX 07.

**MISE AU POINT D'UN TEST D'EVALUATION
DE LA SENSIBILITE DE *DRECHSLERA TERES*
AU *FLUSILAZOLE*.**

- Rapport de synthèse / réunion du 8 octobre 1993 -

Participants :

Pierre LABEILLE, ingénieur de recherche
Francis MURER, rapporteur national fongicides céréales SPV
Philippe CAGNEUL, DU PONT DE NEMOURS France
René BAUDUIN, responsable laboratoire SRPV Reims

GENERALITES

1) PRESENTATION :

Ce rapport est consacré à l'étude de *DRECHSLERA teres* (Sacc.) SHOEMAKER, agent pathogène fongique d'une des Helminthosporioses de l'orge et communément dénommé *D. teres*. Il s'agit de la forme conidienne du champignon. La forme parfaite appartient au genre *PYRENOPHORA* (*PYRENOPHORA teres* DRECHSLER).

C'est un pathogène des escourgeons, des orges d'hiver et de printemps, non systémique, à contamination foliaire, dont l'action se manifeste sur le limbe des premières feuilles développées avec possibilité de repiquages successifs sur les feuilles les plus jeunes en cours de végétation. L'épi évolue normalement, tout en pouvant présenter une réduction de la taille et du nombre de grains (Smedegard-Petersen, 1976).

Cette maladie a été largement observée et décrite, car elle est répandue dans toutes les régions chaudes et humides du globe où l'orge est cultivée (Zillinsky, 1983). Elle a été signalée pour la première fois en France en 1930 par Nicolas et Aggery. L'importance économique des dégâts attribués à *D. teres* n'est pas négligeable, puisque généralement les pertes de rendements enregistrées peuvent atteindre jusqu'à 10% du poids de mille grains (Cavelier, 1992), voire 25% en cas d'attaque grave comme ce fut le cas dans la Marne en 1980 (Chauvel, 1982).

En France comme à l'étranger, cette maladie est en recrudescence depuis 1976 (Harranger, 1980) notamment dans le nord, le nord-est et le sud-ouest, sévèrement touchés en 1981. A ce jour, l'Helminthosporiose reste préoccupante dans ces régions comme le montre la *figure 1*, car elle est la maladie la plus importante et la moins bien contrôlée de l'orge (communication personnelle, F. Murer, 1993).

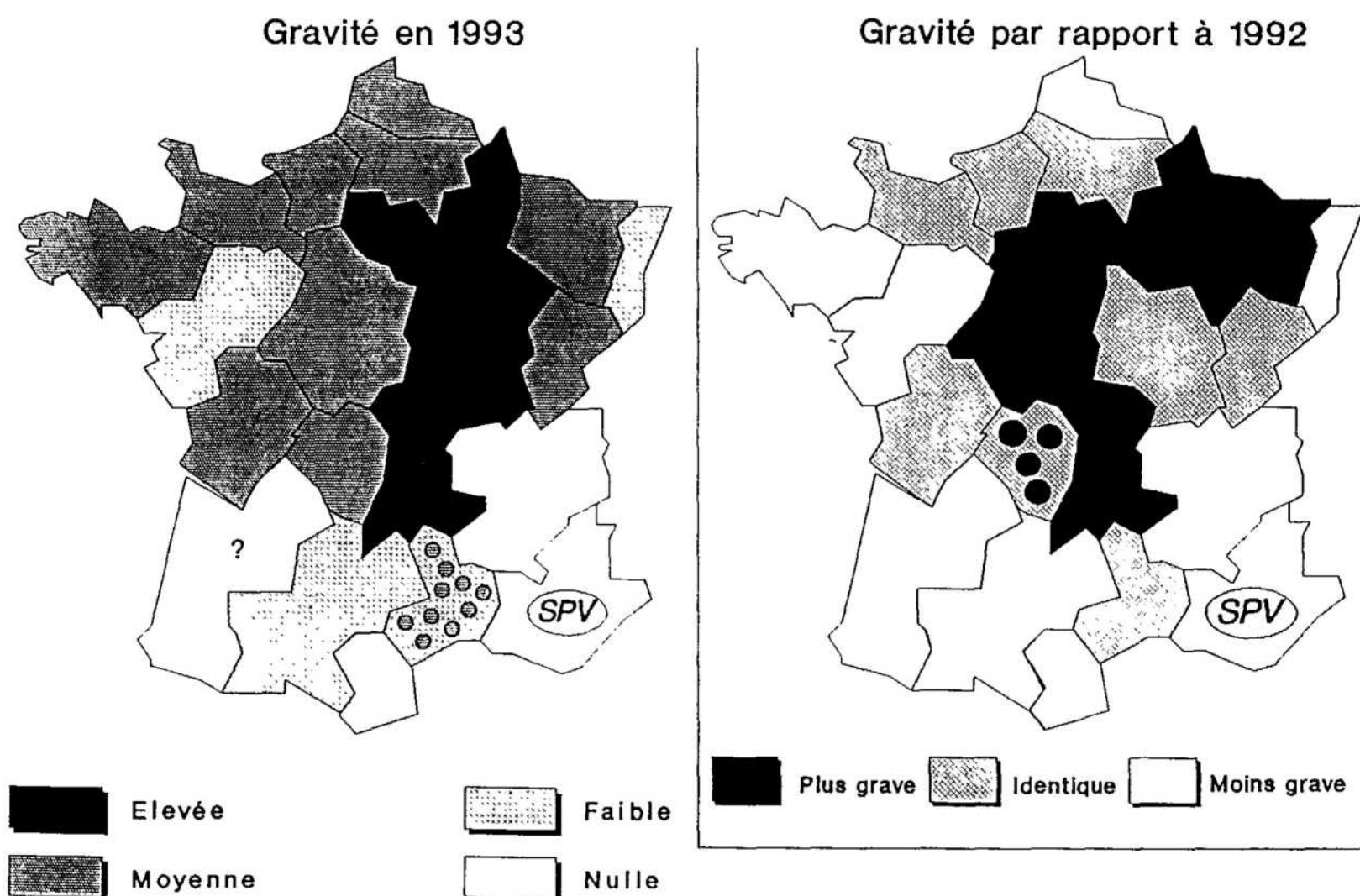


Figure 1 : situation du complexe HELMINTHOSPORIOSE-TACHES BRUNES de l'orge en 1993.

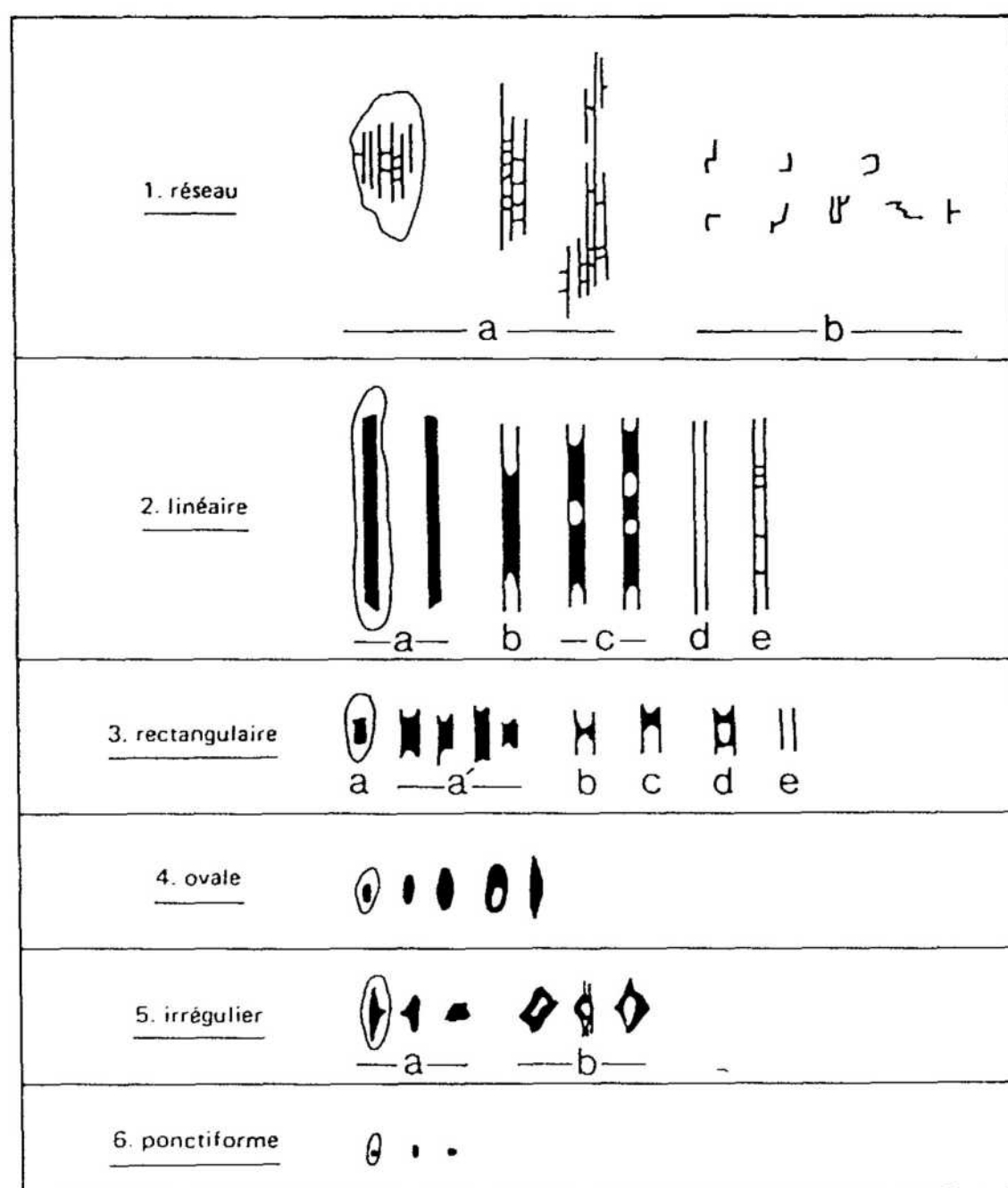


Figure 2 : types de taches occasionnées par *D. teres* sur feuilles d'orge.

Il semblerait que l'évolution de ce pathogène ait été favorisée au moins par les deux événements suivants, si l'on excepte des conditions climatiques localement favorables :

- la généralisation des traitements fongicides contre les autres représentants du complexe phytopathologique de l'orge, qui, inefficaces contre *D. teres*, modifieraient les équilibres fongiques et favoriseraient l'installation de ce parasite (Barrault et de Merleire, 1980).

- les nouvelles conditions de lutte intensive, avec notamment l'augmentation des surfaces d'orge et le raccourcissement des rotations (Locke, 1981), mais également les mises en jachère (communication personnelle, R. Bauduin, 1993).

Pour lutter contre ce pathogène, les fongicides constituent une arme efficace, complémentaire des méthodes culturales (Bendhamane, 1993), pourvu que l'on utilise des méthodes de lutte fiables (Caron, 1983). Les matières actives les plus performantes au champ sont des triazoles (*flusilazole* et propiconazole) et des imidazoles (prochloraze et imidazole), avec respectivement 50 et 30% d'efficacité (I.T.C.F., 1993). On retrouve cette prépondérance *in vitro*, en particulier sur la croissance mycélienne de *D. teres* (Bendhamane, 1993).

Cependant depuis quelques années, le réseau de surveillance des maladies des céréales du service de la protection des végétaux, constate une baisse d'efficacité des fongicides sur Helminthosporiose de l'orge. Ces observations concernent en premier lieu les fongicides à base de *flusilazole*, de par leur position dominante sur ce marché. Ainsi, au delà des aléas climatiques conjoncturels et des positionnements des traitements, se pose le problème d'une possible résistance du pathogène. Nous allons étudier cette hypothèse *in vitro*, avec la mise au point d'un protocole d'évaluation de la sensibilité de *D. teres* au *flusilazole*. Nous la validerons si des différences significatives de sensibilité au *flusilazole*, sont observées entre souches provenant de parcelles traitées et témoins.

A ce sujet, Bendhamane (1993) rappelle que des souches de *D. teres* résistantes à l'imidazil et au triadiménol ont été détectées sur des semences d'orge (Sheridan, 1985), et qu'Olvang (1988) a montré l'existence de souches résistantes au propiconazole et au prochloraze.

2) SYMPTOMATOLOGIE :

Les symptômes de *D. teres* sont essentiellement présents sur les limbes foliaires de l'orge (Rapilly, 1962). Les différents faciès qui lui sont imputés se regroupent en six types (classification de Berdugo, 1968 ; revue et précisée par Barrault, 1981) et sont schématisés en *figure 2*. Ils se présentent sous la forme d'une nécrose brun foncée de taille variable pouvant être entourée d'un jaunissement (chlorose périnécrotique).

Néanmoins, le diagnostic visuel reste délicat : si les symptômes symétriques par rapport au limbe (1, 2, & 3) et ceux entourés d'un halo jaunâtre sont typiques de *D. teres*, dans les autres cas, des confusions restent possibles avec les symptômes d'autres maladies de l'orge. Ces symptômes sont regroupés sous le vocable de "taches brunes" (Chauvel, 1982).

3) EPIDEMIOLOGIE :

Comme le rappelle Chauvel (1982), le cycle biologique de *D. teres* se distingue par la variété de ses formes de conservation et de multiplication. Pour simplifier, dès l'automne les sclérotés et les chlamydospores situés au niveau des pailles, des débris de récoltes et des repousses vont produire puis disséminer des conidies, agents parasites des jeunes plants : c'est la *contamination primaire*.

Au printemps, différentes conditions climatiques sont nécessaires à la propagation de la maladie dans le champ (Caron, 1983) :

- *contaminations secondaires* :
 - *sporulation conidienne* : 15 à 20°C, forte humidité, lumière.
 - *transport aérien de ces conidies* : vent.
- *germination conidienne* : 3 à 31°C (opt. : 18 à 24°C), H.R. de 95% (80% mini).
- *développement du mycélium* : 5 à 35°C (opt. : 18 à 20°C).

SOUCHE 4 A	dose de matière active utilisée (en p.p.m.)						
jour mesure	0	0.001	0.01	0.1	1	10	100
4	3.2	3.1	3.0	2.2	0.9	0	0
5	4.5	4.3	4.3	3.0	1.5	0	0
6	6.2	6.2	6.2	4	2.2	0	0
7	7.7	7.5	7.4	4.5	2.6	0	0
8	9.3	9.1	9	5.7	3	0.3	0
11	13.8	13.8	13.8	8.6	4.5	0.7	0
12	.	.	.	.	5.5	0.9	0
13	.	.	.	.	5.9	1	0

SOUCHE 4 B	dose de matière active utilisée (en p.p.m.)						
jour mesure	0	0.001	0.01	0.1	1	10	100
4	3.1	3.1	2.9	2.1	0.9	0	0
5	4.5	4.3	4.1	3.0	1.0	0	0
6	6.4	6.2	6.1	4.5	2	0	0
7	7.7	7.5	7.3	5.2	2.2	0	0
8	9.4	9.2	9.1	6.2	3	0.3	0
11	13.8	13.8	13.8	8.6	4.6	0.7	0
12	.	.	.	.	5.4	0.9	0
13	.	.	.	.	6	1	0

TABLEAU 1 : mesure de la croissance d' une souche de *D. teres* : souche 4 de la collection.

METHODOLOGIE

1) PRESENTATION :

La mise au point du protocole d'étude de la sensibilité de *D. teres* au flusilazole in vitro comprend à la fois une partie expérimentale et une analyse statistique des données recueillies. Les paramètres expérimentaux sont :

- le nombre de souches
- le nombre de répétitions
- les jours de mesures
- les concentrations en flusilazole (en p.p.m. de matière active).

La valeur de ces variables a été fixée arbitrairement dans un premier temps. La répétition des deux phases du test va permettre d'affiner ces valeurs et de répondre aux questions suivantes :

- comment caractériser une souche ?
- peut-on classer ces souches en groupes homogènes ?
- quelle est l'importance de chaque groupe ?

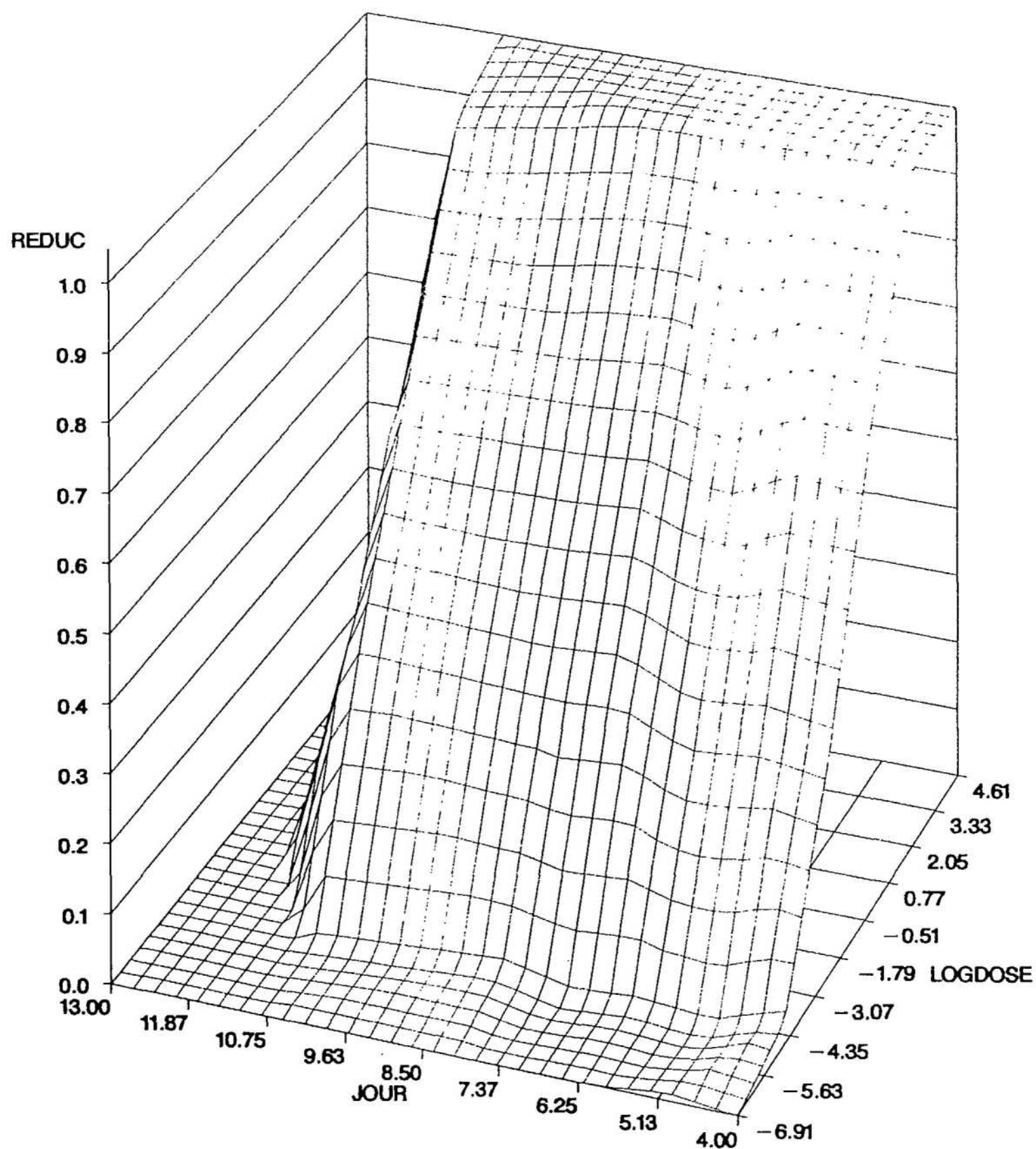
2) EXPERIMENTATION :

Le protocole mis au point se présente de la façon suivante :

- mise en culture in vitro de fragments foliaires comportant des symptômes typiques de *D. teres*. Le milieu utilisé est le P.D.A. (Pomme de terre - Dextrose - Agar).
- purification du mycélium par repiquages successifs sur ce même milieu.
- identification du mycélium de *D. teres* par observation microscopique.
- confirmation du diagnostic par la "P.C.R." (Polymer Chain Reaction), appelée également "technique d'amplification du génôme par voie enzymatique".
- confrontation in vitro du mycélium de *D. teres* à une gamme de concentrations croissantes du fongicide testé.
- mesure de la croissance mycélienne de chaque souche à différents jours. Un exemple est présenté dans le *tableau 1*.

Cette technique a été appliquée dans un premier temps sur des souches en *collection* ("souches domestiques"). Nous avons ensuite réalisé un essai avec des souches isolées directement à partir de symptômes foliaires ("souches sauvages") de même origine géographique (l'Aisne), avec un lot référencé *lot 62* provenant d'une parcelle traitée au PUNCH C (flusilazole + carbendazime), et un lot d'une parcelle non traitée référencé *lot 59*.

VARIATION DU TAUX DE REDUCTION DU DIAMETRE
SELON LE LOG DE LA DOSE ET LE JOUR DE MESURE
SOUCHE=4



Etude D. teres — SRPV "Champagne" 1993

Figure 3 : courbe d'évolution du taux de réduction d'une souche de *D. teres* in vitro en fonction des doses de fongicides et des jours de mesures

Pour l'expérimentation, nous avons travaillé dans les conditions suivantes :

- nombre de souches testées par essai : 10
- concentrations en flusilazole (en p.p.m.) : 0, 10⁻³, 10⁻², 10⁻¹, 1, 10, 100
- durée des mesures de croissance après mise en présence avec le fongicide (en jours) : 13
- nombre de répétitions par essai : 2.

3) ANALYSE STATISTIQUE :

La représentation graphique de l'évolution du taux de réduction d'une souche en fonction des doses de fongicides et des jours de mesures nous permet d'observer une courbe en forme de sigmoïde, dont un exemple figure ci-contre (figure 3) :

L'*analyse Probit* permet de linéariser les données qui suivent une évolution de cette forme. Nous avons étudié la possibilité d'exploiter nos données de cette façon en calculant pour chaque souche l'équation de sa droite de régression. Cette équation est de la forme :

$$\text{Probit(D.R.S.)} = a * \text{Log(dose)} + b * (\text{jour}).$$

- le **D.R.S.**, taux de réduction pour une souche donnée à une dose donnée, est mesuré par le rapport :

$$\text{DIAM. traité} - \text{DIAM. témoin} / \text{DIAM. témoin}.$$

- **a** et **b** sont respectivement les coefficients des variables Log(dose) et jour.

Les valeurs de ces coefficients ont été calculées par *analyse Probit* avec le logiciel S.A.S. (Statistics Analysing System) pour chaque souche. Pour être exploitables, elles doivent être significatives au seuil de 95%, donc $(\text{Pr} > \text{chi}) < 5\%$. Les résultats de cette étude pour les souches de la *collection* sont présentés dans le *tableau 2* :

	S 1	S 2	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S 10
coef. dose (a)	0.43	0.52	0.54	0.47	0.47	0.54	0.45	0.54	0.58
Pr >chi	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
coef. jour (b)	0.77	0.67	0.69	0.61	0.62	0.66	0.44	0.58	0.69
Pr >chi	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43

Tableau 2 : *valeur et validité des coefficients des droites de régression des souches de la collection.*

Dans cette étude, les valeurs des coefficients doses apparaissent hautement significatives contrairement à celles des coefficients jours. Le coefficient jour ne peut donc être pris en compte par l'*analyse Probit*. Dans ce cadre, chaque souche sera caractérisée par une équation de la forme ci-dessous, les jours étant considérés comme répétitions de mesures :

$$\text{Probit(D.R.S.)} = a * \text{Log(dose)} + b.$$

- **a** (coefficient dose) représente la pente de la droite.
- **b** en est l'ordonnée à l'origine.



RESULTATS

1) CARACTERISATION DES SOUCHES :

Nous avons choisi de caractériser chaque souche par sa valeur de $C.I._{50}$. La $C.I._{50}$ représente la concentration en matière active capable de réduire de moitié la croissance d'une souche. Elle est déterminée par le rapport b/a à partir de l'équation précédente. Les $C.I._{50}$ de l'ensemble des souches testées au cours de l'expérimentation figurent dans le *tableau 3*.

	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S 10
collection	0.18	0.3	.	0.29	0.28	0.28	0.31	0.35	0.33	0.3
lot 59	0.04	0.06	0.12	0.02	0.92	0.14	0.09	.	0.06	1.03
lot 62	0.28	0.06	0.26	0.15	0.32	0.04	0.03	0.11	0.18	.

Tableau 3 : valeur des $C.I._{50}$ de l'ensemble des souches de *D. teres* testées.

Les $C.I._{50}$ des souches de la *collection* apparaissent relativement homogènes, comparées à celles obtenues pour les souches des *lots 59* et *62*. Il semblerait donc que les repiquages diminuent l'agressivité des souches *D. teres* vis à vis du *flusilazole*.

De fait, si l'utilisation de souches de la *collection* s'est avérée utile dans la mise au point du protocole expérimental et de la méthode d'analyse des données, ce sont surtout les résultats des *lots 59* et *62* qui vont nous renseigner sur la sensibilité de *D. teres* au *flusilazole*.

Ces résultats montrent également la nécessité de modifier le choix des doses de fongicides utilisées. En rapprochant cette gamme des valeurs de $C.I._{50}$ déterminées pour les souches des *lots 59* et *62*, nous améliorerons ainsi la précision de l'analyse *Probit* pour l'étude d'autres "souches sauvages".

Il conviendrait donc d'ajuster notre gamme de *flusilazole* de la façon suivante :

- supprimer les doses 10^{-3} et 100 p.p.m. du protocole.
- insérer les doses $5 \cdot 10^{-2}$ et $5 \cdot 10^{-1}$ p.p.m..

2) CLASSIFICATION DES SOUCHES :

Cette opération a pour objet de détecter la présence de groupes homogènes au sein d'une population de souches. Dans ce cadre, nous avons appliqué le *test de Student-Newman & Keuls* aux coefficients doses (**a**) et aux ordonnées à l'origine (**b**) des équations de régression de l'ensemble des souches étudiées. Ces analyses permettent de regrouper les souches selon leur sensibilité au *flusilazole* représentée par la $C.I._{50}$ (ce test n'est pas applicable directement aux $C.I._{50}$). Les résultats de ces analyses figurent dans les tableaux 4, 5, 6 et 7.

	S 1	S 5	S 6	S 4	S 2	S 10	S 7	S 9	S 8
C.I.50	0.18	0.28	0.28	0.29	0.3	0.3	0.31	0.33	0.35
Classif. selon (a)	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Classif. selon (b)	A	B	B	B	B	B	B	B	C

Tableau 4 : classification des souches de la collection d'après le test de Student.

Concernant les souches provenant de la *collection*, l'analyse ne relève pas de différences selon les coefficients doses (a). Par contre, il apparaît trois groupes selon l'ordonnée à l'origine (b) : la souche 8 forme un groupe, de même que la souche 1, les autres souches étant réunies dans un dernier ensemble.

Malgré les faibles différences existantes entre les C.I.₅₀ de ces souches, ce test distingue bien des différences de sensibilités significatives au flusilazole. Nous allons donc pouvoir l'appliquer aux résultats des *analyses Probit* réalisées sur les souches de *D. teres* isolées à partir des lots 59 et 62 (voir tableaux 5, 6 et 7)

	S 4	S 1	S 9	S 2	S 7	S 3	S 6	S 5	S 10
C.I.50	0.02	0.04	0.06	0.06	0.09	0.12	0.14	0.92	1.03
Classif. selon (a)	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Classif. selon (b)	BC	BC	A	BC	BC	BC	BC	D	D

Tableau 5 : classification des souches du lot 59 d'après le test de Student.

Comme dans le cas précédent, c'est l'ordonnée à l'origine (b) qui permet de séparer les souches du lot 59 en sous-populations :

- le groupe BC pour les 6 souches sensibles du lot.
- le groupe D pour 2 autres plus tolérantes.
- la souche S 9 a été visiblement répertoriée dans le groupe A par erreur.

Cette classification montre des différences de sensibilité au *flusilazole* au sein de cette population, mais le faible nombre de répétitions (2) nuit à la précision de l'analyse (groupe BC). Cette faiblesse du protocole peut être également à l'origine d'erreurs de classement.

	S 7	S 6	S 2	S 8	S 4	S 9	S 3	S 1	S 5
C.I.50	0.03	0.04	0.06	0.11	0.15	0.18	0.26	0.28	0.32
classif. selon (a)	A	A	A	A	A	A	A	A	A
classif. selon (b)	BC	BC	BC	BC	BC	CD	BC	BC	CD

Tableau 6 : Classification des souches du lot 62 d'après le test de Student.

Avec des écarts de C.I.₅₀ plus faibles que pour les souches du lot 59, (b) permet difficilement de séparer deux groupes (BC avec 7 souches et CD avec 2 souches) dans la population du lot 62, avec de plus une erreur de classement (S 9).

Ces observations confirment l'analyse précédente sur la nécessité d'augmenter le nombre de répétitions.



	lot 59	lot 62
C.I.50	0.27	0.16
Classif. selon (a)	A	A
Classif. selon (b)	A	A

Tableau 7 : *Classification des lots de souches 59 et 62 d'après le test de Student.*

Ce test ne permet pas de distinguer des écarts de sensibilités significatifs au *flusilazole* entre les souches de la parcelle témoin (*lot 59*) et celles de la parcelle traitée (*lot 62*), et ce malgré une répartition différente des C.I.₅₀ entre les deux lots. Si cette information semble intéressante, elle demande néanmoins à être confirmée avec un échantillonnage plus important.

3) IMPORTANCE DE CHAQUE GROUPE :

Pour la déterminer, une modification de la taille de l'échantillonnage et du nombre de répétitions s'impose. Dans le cadre de la mise au point du protocole et de la méthode d'analyse, nous avons travaillé avec un nombre réduit de souches (10 unités) et de répétitions (2). Ces conditions permettent de classer les souches de *D. teres* en groupes de sensibilité distincte au *flusilazole* mais pas d'en estimer les proportions exactes. D'un point de vue statistique, il faudrait maintenant travailler avec 50 souches et réaliser 4 répétitions par souche . Des ajustements statistiques permettront de réduire ces valeurs à l'avenir.

CONCLUSION

Les résultats de cette étude *tendent à écarter* l'hypothèse d'une résistance de *D. teres* selon notre définition. Néanmoins, il faudra attendre la validation de ce test à une échelle supérieure pour en avoir la confirmation. Pour y parvenir, nous avons défini les nouveaux paramètres expérimentaux de la façon suivante :

- nombre de souches testées par essai : 50.
- concentrations en flusilazole (en p.p.m.) : 0, 10^{-2} , $5 \cdot 10^{-2}$, 10^{-1} , $5 \cdot 10^{-1}$, 1, 10.
- jours des mesures de croissance après repiquage sur P.D.A. + fongicide : J+3, J+5, J+7.
- nombre de répétitions par essai : 4.

Les prochaines étapes de la mise au point de ce protocole se définissent de la façon suivante :

- validation du test avec des souches de *D. teres* des lots 59 et 62.
- mise en oeuvre du test sur d'autres lots d'origines géographiques différentes.

BIBLIOGRAPHIE

BARRAULT :

"Symptomatologie d'H. teres et des tâches brunes de l'orge.

Biologie d'H. teres."

Perspectives agricoles, 1982, N° 58, p. 25-29.

BARRAULT, DE MERLEIRE et ROUZET :

"Une helminthosporiose des orges et des escourgeons."

Phytoma, 1980, N° 319, p. 17-19.

BENDHAMANE, BARRAULT, ALBERTINI et TOUBIA-RAHME :

"Etude de l'action in vitro de divers fongicides sur le développement de D. teres f. teres et f. maculata".

Phytopathologia mediterranea, 1992, N° 31, p. 77-84.

BERDUGO :

"Morphologie, biologie et symptomatologie de Pyrenophora teres.

Contribution à la connaissance des Helminthosporioses de l'orge".

Thèse de Docteur Ingénieur N° 190, 1968, Université Paul Sabatier, Toulouse, FRANCE.

CARON :

"L'helminthosporiose de l'orge".

Phytoma, 1983, N° 347, p. 9-11.

CAVELIER :

"L'helminthosporiose de l'orge".

Les maladies des céréales, 1992, fiche N° 7, Station de Phytopathologie, Gembloux, BELGIQUE.

CHAUVEL :

"Contribution à l'étude de la biologie et l'épidémiologie d'Helminthosporium teres Sacc., parasite de l'orge."

Mémoire d'Ingénieur d'Agronomie, 1982, Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques Appliquées, Dijon, FRANCE.

HARRANGER :

"Les tâches brunes de l'orge".

Phytoma, 1982, N° 334, p. 17-19.

Institut Technique des Céréales et des Fourrages :

"Orge : l'Helminthosporiose difficile à combattre".

Cultivar, 1993, N° 333, p. 59.

LOCKE :

"Net blotch of barley".

Report of a study tour undertaken in Denmark, West Germany, the Netherlands and France, 27 may - 5 june 1981, Ministry of agriculture, fisheries and food agricultural development and advisor service.

NICOLAS et AGGERY :

"Une attaque intense d'Helminthosporiose dans la Haute-Garonne".

Revue de pathologie végétale et d'entomologie agricole de France, 1930, N° 17, p. 7-8.

RAPILLY :

"L'helminthosporiose en réseau".

L'helminthosporiose, 1964, fiche N° 2, Institut National de Recherche Agronomique, Station de pathologie végétale, Versailles, FRANCE.

SMEDEGAARD-PETERSEN :

"Pathogenesis and genetics of net-spot-blotch and leaf stripe of barley caused by *Pyrenophora teres* and *Pyrenophora graminea*."

D.S.R. Forlag. Roy. Vet. Agric. Univ., 1976, 176 p., Copenhagen, DANEMARK.

ZILLINSKY :

"Rayure réticulée (Net blotch)".

Maladies communes des céréales à pailles, 1983, p. 29, Ed. CIMMYT.

